

Acta Médica
Grupo Ángeles

Volumen **1**
Volume

Número **2**
Number

Abril-Junio **2003**
April-June

Artículo:




De oocitos *in vivo* a *in vitro* y a clonación:
Reminiscencias de un investigador en
biomedicina

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Grupo Ángeles Servicios de Salud

**Otras secciones de
este sitio:**

-  **Índice de este número**
-  **Más revistas**
-  **Búsqueda**

***Others sections in
this web site:***

-  ***Contents of this number***
-  ***More journals***
-  ***Search***



Medigraphic.com



De oocitos *in vivo* a *in vitro* y a clonación: Reminiscencias de un investigador en biomedicina

Mario Castañeda*

En 1969 después de haber trabajado en algunos aspectos moleculares del desarrollo temprano del huevo (oocito fertilizado) de erizo de mar proveniente de la fertilización *in vitro* (FIV), era difícil imaginar que algún día se podría contar con tantos oocitos de mamífero en un medio de cultivo como los que yo obtenía directamente del erizo hembra. La FIV de oocitos humanos en los años 70 había alcanzado ya su umbral clínico (el primer humano, mujer, nació en julio de 1978); aunque dichos oocitos eran obtenidos laboriosamente (aun los de ratón nos ponían en problemas). Todavía en ese tiempo, en las clases y seminarios sobre desarrollo embrionario y diferenciación celular, se tenía que poner un esfuerzo adicional para convencer al auditorio de que la información genética requerida para la producción de cualquier tipo de célula diferenciada, sea una neurona o un fibroblasto, estaba presente en toda célula del organismo. Es decir, ni el hepatocito había perdido el gen responsable de la síntesis de ácido gamma-amino aminobutírico ni la neurona el de la albúmina, por ejemplo. El problema se encontraba en la regulación diferencial de la expresión del genoma, de un genoma íntegro en relación al de las células primordiales. Mas ese trabajo era ampliamente recompensado al poder mostrarles datos, ante su asombro, de que era posible tomar una célula diferenciada de la epidermis (en ese caso de la zanahoria) y en ausencia de gametos, producir, manipulando la constitución del medio de cultivo, una planta de zanahoria completa y fértil

(el primer ejemplo, en un laboratorio formal, de clonación en multicelulares). Era como tomar un pellizco de nuestra piel del antebrazo y de ahí obtener un humano bromeaba yo, sinceramente, con ellos. A pesar de las sorprendentes consecuencias de esos datos, nuestras mentes tomaban cierto solaz en la mansa y acogedora seguridad emocional de que aunque interesantes, pertenecían a organismos “inferiores”. ¿Nosotros? Nosotros éramos, obviamente y desde luego, otra cosa.

Unas décadas después, en 1997, el reporte de la existencia de Dolly volvió a asombrar nuestros modelos mentales sobre los mecanismos de la reproducción. La clonación (término empleado en ciencia con el modelo bacteriano de biología molecular) de organismos multicelulares era ya conocida con anterioridad,¹ pero Dolly no era “cualquier organismo inferior”, era una clona mamífera (del griego klon = retoño en el diccionario de la lengua española, pero “rama” en los anglosajones y más apropiado en su sentido científico). Además, difícil de ignorar por su tamaño y porque había completado exitosamente su desarrollo prenatal; a diferencia de los intentos previos con otros organismos en los que sólo se llegaba a etapas embrionarias. La clonación es una invención biológica que se presenta ampliamente en los insectos en el proceso de partenogénesis. En cuanto al humano, éste la ha usado desde tiempo inmemorial en horticultura al propagar plantas por medio del sembrado de sus ramas. La obtención de organismos humanos por las técnicas de reproducción asistida (alrededor de un millón actualmente) estaba ya siendo digerida por nuestras mentes; digestión facilitada porque en esos casos se utilizaron las células “correctas”: un oocito y un espermatozoide. Dolly fue obtenida con una “célula incorrecta” — semejante al caso anterior de la zanahoria en la que se empleó una célula somática (reproducción asexual de un organismo sexual)—, específicamente, con un núcleo somático (de la ubre) y entonces incorrecto por no ser el del espermatozoide; incorrecto sí, pero obviamente suficiente. En febrero de 2003, a causa de una grave neumonía (común entre los borregos), se le practicó eutanasia. Cumplía 6 años y padecía también de artritis. ¿Envejecimiento prematu-

* Ex-investigador Titular “C”. Universidad Nacional Autónoma de México

Correspondencia:
Dr. Mario Castañeda.
Fuente Murmullos 87-101
Lomas Palmas 52788
Huixquilucan, Estado de México
Correo electrónico: marjorcast@cts.com

Aceptado: 02-06-2003.

ro? En realidad esto no se puede afirmar todavía, pero ella formará parte de la muestra permanente del Museo Nacional de Escocia. ¿Clonada en verdad? Si por clonación entendemos, como en las bacterias, virus y plásmidos, *verum dicere* una copia exacta, la respuesta es no. La clonación de puercos (en la Universidad Texas A&M) produce camadas con miembros diferentes entre sí, tanto en conducta como en el pelaje y en el número de dientes. Sus diferencias son del mismo tipo que las vistas en camadas obtenidas en forma tradicional. Quizá de interés y en espera de que se repita, si los huevos clonados son puestos en diferentes madres gestacionales las diferencias en las camadas resultantes son más obvias (las consecuencias del microquimerismo, pequeño número de células de la madre en los hijos adultos y viceversa, son desconocidas). Esas diferencias también se han observado en dos gatos productos de la misma clonación (en el mismo sitio anterior) y de vacas (en *Advance Cell Technology*, Worcester, Mass.). Recordemos también que en gestaciones múltiples de tipo sexual en humanos sucede lo mismo. En noviembre de 2001 *Advance Cell Technology* reportó la clonación del primer embrión humano, aunque degeneró en los primeros blastómeros representa la prueba del principio de que quizá sea posible; sin embargo, esta posibilidad presenta problemas técnicos inmediatos, intentos de clonar embriones de monos rhesus fallaron por distribución desigual de cromosomas en las células hijas. Proteínas indispensables en este proceso y localizadas en los cromosomas parecen ser eliminadas durante la transferencia nuclear. Los anuncios de la secta de Rael (piloto de autos de carrera) que dicen haber encontrado extraterrestres son solamente eso. Todas estas manipulaciones dejan mucho que desear en cuanto a eficiencia (en el caso de Dolly fue de un 0.36%). Aunque la frecuencia de defectos del recién nacido es de un 4.2% en gestaciones tradicionales, de un 9.2% en FIV y de un 8.6%² en inyección intracitoplásmica la diferencia es enorme. De interés terapéutico, estos avances han facilitado el trasplante de órganos y tejidos con un porcentaje alto de histocompatibilidad al escoger entre embriones candidatos a un segundo hijo(a) al inmunológicamente más adecuado para un primer hijo(a) con una necesidad vital de dicho órgano (gestación sobre demanda médica, la primera en 1966); con esto último, a su vez, el diagnóstico preimplantación de enfermedades hereditarias severas y la consecuente selección del embrión sano, libre de la mutación responsable (en el 2002).

Poco después, otra gran sorpresa: resulta posible el cultivo *in vitro* (y por tanto el establecimiento de líneas) de las células “stem” o células madre; originadoras de todas y cada una de las diferentes estirpes celulares de

un organismo multicelular. Con ello, la posibilidad e incluso realización ya de trasplantes celulares a, por ejemplo, cerebro (Parkinson, Alzheimer), médula espinal (parálisis), médula ósea (leucemias), corazón (remodelación postinfarto) y directamente a sangre en un modelo experimental de esclerosis múltiple.³ Estas líneas de células madre provienen de las células de la masa interna de la blástula o de tejidos adultos (también de teratomas pero no son usadas por su obsolescencia). Ambas líneas celulares sólo son capaces de dar estirpes celulares somáticas (las de embriones mejor que las de adulto) y por ello son llamadas pluripotentes. Aun así, esta pluripotencialidad se ha puesto en duda al demostrarse, en el caso de células madre de médula ósea trasplantadas a hígado y transdiferenciadas a hepatocitos, que esta transformación no es real sino sólo el resultado de la fusión celular con un hepatocito original, aunque se producen núcleos de regeneración hepática.⁴ Dada la necesidad de destruir al embrión para obtener las embrionarias, “embryonic stem cells” (ESC’s), el uso de estas células está actualmente proscrito en los Estados Unidos (EUA) cuando su financiamiento es federal (a partir del 9 de agosto de 2001) aunque no en Inglaterra. Como en el caso de los inicios de la FIV, el manejo de oocitos y de embriones ha generado una gran discusión sobre el uso de ESC’s en clonación reproductiva (la cual nadie intenta hacer por ineficiente e incierta en cuanto a la patología embrionaria y postnatal) y en la llamada clonación terapéutica (el humano no ha clonado estas células, no ha habido enucleación y transferencia de otro núcleo, son clones de ellas mismas al autorreplicarse como en el caso bacteriano), aplicación grande y dolorosamente requerida. En los EUA existen unos 11,000 embriones congelados que han sido donados para investigación (o en su defecto estérilmente destruidos) y que darían unas 200 nuevas líneas de ESC’s, en comparación a las 11 que en la actualidad son utilizables y para las cuales hay permiso legal. La *Coalition for Advancement of Medical Research* (que incluye la *Christopher Reeves Paralysis Foundation* y la *Parkinson’s Disease Foundation*) presentará al congreso sus argumentos para revertir la prohibición y la revista *Science* del 9 de mayo de 2003 publica un editorial de su editor en jefe y dos contribuciones más en favor del uso de ESC’s en investigación.

Ante este clima social, y sin duda por sí misma, llega la sorpresa de la tecnología biológica (en el campo de biología del desarrollo) más reciente y más significativa en cuanto a los aspectos legales, éticos, morales, biológicos y médicos de la clonación en humanos: ¡la obtención de ESC’s totipotenciales! Es decir, productoras también de células germinales; oocitos en este caso.⁵ ¡Numerosos oocitos en una sola caja de cultivo! Casi como si se trata-

se de bacterias. Para sosiego del aspecto filosófico de nuestra mente, aunque sólo sea temporal, son oocitos de ratón, no de humano. Esto es muy trascendente porque si las ESC's son capaces de dar oocitos, también lo son de dar espermatozoides, por ende, un organismo en ausencia de sexos adultos. El ovario y el testículo se derivan durante la embriogénesis de una gónada común bipotencial. Un receptor nuclear con funciones en la diferenciación de tejidos esteroidogénicos, DAX1 (*Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1*), está involucrado en alguna parte del camino hacia esta disyuntiva. En el síndrome humano de hipoplasia suprarrenal congénita, DAX1 presenta mutaciones y los pacientes muestran desarrollo testicular anormal junto con infertilidad. Las ESC's crecidas *in vitro*, bajo condiciones de diferenciación, producen oocitos primordiales que entran en meiosis, reclutan células adyacentes para formar folículos (indistinguibles de los obtenidos de ovarios y puestos en las mismas condiciones de cultivo) con capa granulosa (probablemente también con teca hacia el día 35) y secreción de estradiol al medio. Al parecer, las ESC's siempre han sido totipotenciales, el problema había sido demostrarlo. Recordándonos, una y otra vez, que en la ciencia "la ausencia de evidencia no es evidencia de ausencia", es decir, la inherente debilidad de datos negativos. Cuando el huevo se divide, sus células resultantes son morfológicamente indistinguibles entre sí durante toda la morulación (excepto en algunos organismos como el erizo de mar). El camino obvio en esta época molecular es ir a las moléculas (la biología ha evolucionado de una biología de organismos a una de moléculas y ahora a una de información donde se pretende leer la biblioteca de la vida cuyos tomos se han ido escribiendo desde hace unos 3.5 mil millones de años). Mas uno no puede ver moléculas dentro de una célula viva. Gracias quizá a su concepción femenina, esto es posible si se les reviste vistosamente de manera que sean visibles dentro de una multitud. Vistosa y sanamente, pues marcarlas con radiactividad es deletéreo y sin utilidad aquí. Un vestido rojo y con lentejuelas podría servir, en este caso, una proteína fluorescente. Como la utilizada en pececillos comerciales con el corazón fluorescente y recientemente, en Taiwan, con el cuerpo entero. Además, la molécula debe ser específica a la célula de interés. De manera sucinta, el grupo de Filadelfia usó el gen de una proteína de fluorescencia verde regulado por el promotor de otro gen, específicamente expresado por el oocito, para marcar dichas células. Una vez que esta construcción génica fue introducida por electroporación a las ESC's, en cuanto éstas produjeran oocitos, éstos serían localizados. Y lo fueron. Para mayor confirmación, la expresión de otros genes específicos fue medida por trans-

criptasa reversa; cuantificándose además, la aparición de estradiol en el medio de cultivo. Avanzando en el problema general del uso de ESC's en humanos, todo esto pudo lograrse en ausencia de la capa nutriente de fibroblastos de ratón; replicativamente incompetentes pero con virus murinos. Un detalle importante en todo el procedimiento dice Hans R Schöler, investigador principal del grupo, es el sembrado de las ESC's en concentraciones altas ($1-2 \times 10^4/\text{cm}^2$). La aparición de oocitos expresando fluorescencia fue de un 25% hacia los 7 días de cultivo. La posible obtención de espermatozoides requerirá de procedimientos más complejos pues el camino de diferenciación es más largo.

Estos datos indudablemente despiertan una multitud de pensamientos. En vista de que la caja de Petri puede sustituir al ovario, la mujer, en biología de la reproducción, ya no podrá ser conceptualizada (argumento en contra del uso de ESC's) como "la" fuente de oocitos, "the egg farm". Y si las ESC's son orientadas a producir espermatozoides, se puede también dispensar del espermatozoide del hombre. La materia prima para clonaciones podrá estar en la caja de cultivo. La magia del citoplasma del oocito, la capacidad de desprogramar a un núcleo somático y reprogramarlo hacia otros caminos, la mayor magia del proceso de la vida (otra magia actual es la de ¿cómo podemos ser humanos con tan sólo unos 25,000-27,000 genes "tradicionales"), podrá ser utilizada para clonaciones de bebés (posible pero muy poco probable, repito) o de tejidos (médicamente requerida) y sobre todo en investigación; de gran importancia por su mayor trascendencia al intentar descifrar las bellezas de esa magia. Más elocubrativamente, el hombre podría tener también otras funciones: las ESC's XY son igualmente capaces de producir oocitos y folículos. La clonación de un núcleo somático XY en un oocito enucleado (nada puede empezar de la nada), la subsecuente obtención de sus correspondientes ESC's y de ahí oocitos con el X y el resto de los 22 cromosomas, de origen paterno todos y entonces el padre original funcionando como madre, podrán ser fertilizados con espermatozoide de un segundo padre para producir un organismo (mediante la colaboración caritativa de un útero) proveniente de "un padre-madre" y de "un padre-padre". Ni siquiera hay que separar inicialmente los embriones YY pues no son viables. Como sigue mostrando la historia humana, el límite real parece encontrarse en el desenvolvimiento del conocimiento. ¿Problemas de índole no científico? ¡Muchísimos! De conceptualizaciones y por lo tanto de lenguaje y legales: diferentes tipos de padres y madres genéticos, madres gestacionales (que ya existen), responsabilidad legal hacia diferentes tipos de hijos, significados de individualidad, de sexo, de familia, ... de vida y de religión. Ante este tipo de amenazas, el humano repetidamente ha re-

currido a prohibiciones; sin embargo, su historial nos muestra su futilidad. Los sentimientos de moral y altruismo obligados y dirigidos por creencias pueden no ser genuinos, como lo son en el caso de donadores voluntarios de órganos por ejemplo, sino resultado del temor inherente en ese tipo de conducta. ¿Caminos factibles? Desgraciadamente para la *praxis* inmediata, el desenvolvimiento racional, infatigable y decidido si no continuo, de la mentalidad humana. El futuro siempre ha sido difícil y llega demasiado pronto. El problema fundamental es la ignorancia, no el conocimiento.

REFERENCIAS

1. Castañeda M. Clone a su mejor amigo por sólo 2,000 millones. *Rev Sanid Milit* 1997; 51(4): 205-207.
2. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bowel C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. *N Engl J Med* 2002; 346: 725-730.
3. Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003; 422: 688-694.
4. Vassilopoulos G, Wang P-R, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904 (ver también p. 897-901).
5. Hübner K, Fuhrman G, Christenson LK, Kehler J et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300: 1251-1256.

